



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL  
*Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA,  
SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO CIRUJANO**

**AUTOR**

**BURGOS CHIPANA VÍCTOR**

**ASESORES**

**DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ**

**MG. LUIS FERNÁNDEZ SOSAYA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

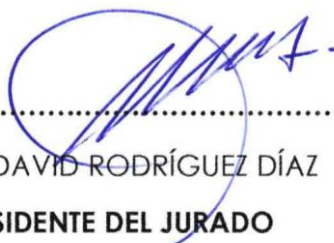
**ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES**

**Trujillo – Perú**

**2018**

**PAGINA DEL JURADO**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922**



.....

DR. DAVID RODRÍGUEZ DÍAZ

**PRESIDENTE DEL JURADO**



.....

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

**SECRETARIA DEL JURADO**



.....

MG. BLGO. JAIME POLO GAMBOA

**VOCAL DEL JURADO**

Trujillo, diciembre del 2018

## DEDICATORIA

*Dedicado a mi Madre quien me apoyo incondicionalmente, con sus palabras y ante las diferentes situaciones que se presentaron a lo largo de este tiempo.*

*Dedicado a todas aquellas personas quienes se cruzaron en mi camino de quienes aprendí lo que debo y no debo hacer y me hicieron crecer como persona.*

**Víctor Burgos Chipana**

## **AGRADECIMIENTO**

**A Nuestro Dios:** quien con su gracia infinita nos permite seguir adelante bendiciéndonos con la vida y salud.

**A mis doctores y asesores:** María Rocío Llaque Sánchez quien con su paciencia y esmero buscaron compartir sus conocimientos y enseñarme lo que ganaron con su experiencia.

**A mi madre** por su paciencia y apoyo que pese a la distancia nunca dejo de estar ahí cuando la necesitaba.

**A la universidad Cesar Vallejo:** que me brindo las aulas y materiales necesarios para poder aprender todo lo que necesito.

**Víctor Burgos Chipana**

## DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo **Víctor Burgos Chipana** con DNI **42264128**, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Cesar Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompaña a la tesis titulada **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922.**

Son:

1. De mi autoría
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas, por lo tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada, es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, diciembre del 2018

**VÍCTOR BURGOS CHIPANA**

**DNI: 42264128**

## **PRESENTACIÓN**

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922”

La cual tiene por objetivo demostrar si existe efecto antibacteriano cuando se asocia el aceite esencial de *Thymus vulgaris* con Oxacilina sobre cepas de *Escherichia coli* y de esta forma poder contribuir como coadyuvante contra la mencionada bacteria.

La presente investigación la someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Víctor Burgos Chipana

## INDICE

PAGINA DEL JURADO .....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD .....	IV
PRESENTACIÓN .....	V
INDICE .....	VI
RESUMEN .....	VII
I. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA .....	2
1.2 TRABAJOS PREVIOS.....	3
1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA .....	6
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	9
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	10
1.6 HIPÓTESIS.....	10
1.7 OBJETIVOS.....	11
1.7.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
1.7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	11
II. MÉTODO .....	12
2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN: .....	12
2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN .....	13
OPERACIONALIZACION DE VARIABLES .....	13
2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	14
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD .....	15
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	16
2.6 ASPECTOS ÉTICOS:.....	16
III. RESULTADOS.....	17
IV. DISCUSIÓN .....	19
V. CONCLUSIONES .....	21
VI. RECOMENDACIONES.....	22
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	23
VIII. ANEXOS .....	27

## RESUMEN

Se realizó un estudio experimental in vitro con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial del *Thymus vulgaris* “tomillo” comparado con la Oxacilina 1ug sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922. Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50%, 25%) y un control neutro con solución salina, se realizaron 10 repeticiones con cada dilución. A la dilución de 100% la media del halo de inhibición fue 15,20 mm (DS:  $1,932 \pm 0,611$  IC 95% (13,82 – 16,58)) entre rangos de 12 a 18 mm. Valores considerados como eficaces en relación al patrón del CLSI ( $\geq 13$  mm), sin embargo, no supera el halo de inhibición de la Oxacilina que fue de 21,35 mm (DS:  $2,381 \pm 0,753$  IC 95% (19,65 – 23,05)). El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo (0.000) la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados eran homogéneos y el grupo con mayor halo de inhibición fue para la oxacilina, seguido del aceite esencial al 100%, 75%, 50% de la planta en estudio evidenciándose que a mayor concentración el halo de inhibición aumentaba. Se concluye que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* si tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 sin embargo, estos no superan al halo de inhibición de la oxacilina.

**Palabras claves:** Aceite esencial, *Thymus vulgaris*, efecto antibacteriano



## ABSTRACT

An experimental in vitro study was performed to evaluate the antibacterial effect of the essential oil of *Thymus vulgaris* "thyme" compared to Oxacillin 1ug on strains of *Escherichia coli* ATCC 25922. Four dilutions were made (100%, 75%, 50%, 25%) and saline solution was used as neutral control, and 10 repetitions were performed for each dilution. For the dilution at 100% average zone of inhibition was 15.20 mm (DS:  $1,932 \pm 0,611$  IC 95% (13,82 – 16,58)) ranging between 12 to 18 mm, values considered effective according to the CLSI pattern ( $\geq 13$  mm); however, it does not exceed the zone of inhibition of oxacillin which was 21.35 mm (DS:  $2,381 \pm 0,753$  IC 95% (19,65 – 23,05)). The ANOVA statistical analysis was highly significant (0.000), Tukey-test showed that the tested groups were homogeneous and the group with the greatest zone of inhibition was the one with oxacillin, followed by essential oil at 100%, 75%, and 50% dilution of the plant under study, demonstrating that the higher the concentration, the greater the zone of inhibition. It is concluded that the essential oil of *Thymus vulgaris* does have an antibacterial effect on *Escherichia coli* ATCC 25922; however it does not exceed the zone of inhibition of oxacillin.

Keywords: Essential oils, *Thymus vulgaris*, antibacterial effect

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA**

La *Escherichia coli* es habitual en el intestino de las personas, esta bacteria tiene diferentes cepas y aunque la mayoría de ellas son inofensivas existen algunas que pueden provocar una grave enfermedad de tipo intestinal e incluso podemos mencionar infecciones del tracto urinario.<sup>1</sup>

Tenemos otro problema mundial que es el uso inadecuado de antibióticos que día a día va creciendo trayendo como consecuencia la resistencia por parte los microorganismos hacia los antibióticos; la propagación de los nuevos mecanismos de defensa por parte de estos es alarmante. Y esto genera una gran preocupación debido a que empezamos a disminuir nuestros métodos para combatir a estas diferentes bacterias.<sup>2</sup>

Así mismo es otro problema el estar expuestos a efectos secundarios por usar estos antibióticos, que nos ayuda contra dichas bacterias, pero pueden producir efectos nocivos en nuestro organismo. Ante esta problemática se busca alternativas que pueden ayudarnos ante estos problemas que acrecientan. Dicha alternativa es el uso de aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas las cuales tienen efectos similares a las drogas sintéticas donde podemos destacar propiedades antiinflamatorias, analgésicas, anti fúngicas y antibacterianas.<sup>2</sup>

En todo el mundo existe una rica variedad de plantas aromáticas las cuales son conocidas y fueron usadas por nuestros ancestros encontrándose evidencia de su uso en antiguas civilizaciones tanto en países del viejo mundo como Sud América donde cabe destacar existieron civilizaciones muy arraigadas a la naturaleza. En el Perú existe una gran variedad de plantas aromáticas donde podemos destacar el uso del *Thymus vulgaris* “Tomillo” cuyo uso y conocimiento es transmitido de generación en generación, y su uso es más acentuado en las poblaciones rurales, donde el acceso a la salud es limitado en nuestro país.<sup>3</sup>

Es por esto que es necesario la investigación de los efectos de estas plantas.

## 1.2 TRABAJOS PREVIOS

**Felipe M. (Colombia, 2015)** Evaluó el uso del aceite Esencial del tomillo tomándolo como un aditivo alimentario, con el objeto de observar el efecto antibacteriano, prolongando de este modo la vida de anaquel del queso Ricotta. Para extraer el aceite esencial del tomillo lo realizó a través del método de arrastre por vapor. Realizó una prueba in vitro donde a través de la formación de halos de inhibición donde determinó la menor concentración con efecto inhibitorio frente a la *L. monocytogenes* Obteniendo los siguientes resultados: AE 2.4%: 1ra repetición 21.67 mm, 2da repetición 19.33mm, 3ra repetición 19.33, donde el control se muestra sin inhibición del crecimiento de la bacteria.<sup>4</sup>

**Luna M. et al (Argentina, 2015)** estudiaron al factor de riesgo que constituye la creciente demanda de frutas frescas y el número de microorganismos que estos pueden albergar, decidiendo inocular el microorganismo *E. coli* para luego bañarlo en aceite esencial de Tomillo y Orégano, los resultados concluyen que los TxI y TxM con aceite esencial de orégano exhibe la mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli*. Los halos de inhibición más altos con desinfecciones combinadas se lograron con aceite de tomillo ( $2,10\text{mm} \pm 0,1$ ) con un tiempo de contacto de 5 min y ( $2,89\text{mm} \pm 0,01$ ) con un tiempo de contacto de 10 min. Combinado con oregano ( $2,53 \pm 0,10$ ) en 5 min y ( $3,05 \pm 0,03$ ) en 10 min. Determinando el uso combinado eficaz.<sup>5</sup>

**Miriam R. et al (Cuba, 2014)** Identificaron la potencialidad de *Thymus Vulgaris* y otras plantas como candidatos para ser nuevos agentes antimicrobianos para el manejo de *Pectobacterium carotovorum*, la evaluación biológica la realizaron con el método de difusión en agar según la técnica estandarizada basada en el método de Kirby-Bauer frente a un control con estreptomicina. De los aceites evaluados solo el tomillo produjo inhibición, por lo que fue el de mayor actividad antibacteriana. Obteniendo resultados de un halo de inhibición de *Thymus vulgaris*: 9 mm y el control 0 mm con una diferencia significativa de  $p= 0,05$ . Mostrando un efecto superior al del antibiótico.<sup>6</sup>

**J. Borboa et al (Mexico, 2010)** evaluaron la actividad antibacteriana del tomillo y otras plantas frente a *Clavibacter michiganensis*, seleccionadas por su actividad bactericida, la técnica que utilizaron para realizar el análisis de la actividad antimicrobiana fue la de difusión en agar, realizado en diferentes diluciones obteniendo los siguientes resultados respecto al tomillo: halos de inhibición en concentración de 1:1 50 mm, concentración 1:5 33 mm, concentración 1:10 21 mm a las 24 horas del ensayo y el halo de inhibición del control del antibiótico que fue estreptomycin 3 mm. El análisis de varianza mostro que existe diferencia significativa  $p < 0.05$ .<sup>7</sup>

**Coy C. (Cuba, 2013)** Estudiaron la composición química por cromatografía gaseosa de 3 aceites esenciales de Tomillo, y otras plantas evaluándose frente a 2 cepas Gram (+) y 2 cepas Gram (-) donde pudieron determinar una mínima diferencia entre el efecto de aceites esenciales aunque por otra parte pudieron determinar que estos aceites podían inhibir la cepa de *Staphylococcus aureus* con un buen porcentaje de halo de inhibición, y obtuvieron como resultados de 2 mm, frente a *E. coli* y como halos de inhibicion del grupo control de ampicilina 6.5 mm, kanamicina 6.8 mm y tetraciclina 10 mm. Estos AE evaluados no presentan un porcentaje de inhibición significativo frente a *E. coli* y *S. tiphy*.<sup>8</sup>

**García R. et al (Perú, 2008)** Revisaron los diferentes mecanismos de acción de carvacrol y timol respecto a los diferentes microorganismos de importancia en los alimentos, pese a que en la actualidad haya variedad de agentes antimicrobianos que utilizan para conservar los alimentos, y dentro de esa variedad se encuentra el timol y el carvacrol, el timol que se obtiene de la extracción de aceites esenciales del tomillo. Y obtienen resultados evaluados respecto al halo de inhibición y se hizo una comparación con un fármaco de control. Siendo los resultados el siguiente: respecto del timol y el fármaco fue estadísticamente similar ( $p \geq 0.05$ ) mostrándose con un halo de 36.7 mm a 37.3 mm.<sup>11</sup>

**R. Macedo et al (Perú, 2016)** evaluó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanolico de *Chamaesyce thymifolia* mediante métodos de macro dilución y difusión en agar. Usando la cepa de *Escherichia coli* y otras 2 cepas usando como control positivo el antibiótico gentamicina y como control negativo agua. Respecto a la actividad antibacteriana del extracto etanolico frente a *E. coli* a concentración de 12 mg con un halo de inhibición de 19.7 mm  $\pm$ 5.0, y en una concentración de 6 mg presenta un halo de 15.7 mm  $\pm$ 5.1 y el resultado del control gentamicina 10 ug fue 20.0  $\pm$ 2.0 determinando buena actividad frente a esta cepa.<sup>9</sup>

**Rojas J. (Perú, 2015)** determinaron la actividad del aceite esencial del tomillo y que combinándolo con EDTA frente a *Cándida albicans*. El AE de *Thymus vulgaris* pudo inhibir el crecimiento de *Cándida albicans* independientemente a la concentración, y produjo halos de inhibición de 30,33  $\pm$  0,58 mm a una concentración de 100 mg/mL. Comparando con el control fluconazol, hubo diferencia significativa con las concentraciones de 50, 75 y 100 mg/mL ( $p = 0,001$ ). El aumentar EDTA 4 mg/mL al AE incremento el tamaño de los halos de inhibición en las diferentes diluciones, siendo mayor con 25 mg/mL (59,5% de incremento).<sup>10</sup>

**De Souza L. et al (Perú, 2008)** evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro de tres tipos extractos, orégano, tomillo, que tiene frente a Hongos, *P. aeruginosa* Gram (-) y *S. aureus* Gram (+). Los resultados indican que los aceites tienen una menor Concentración Mínima Inhibitoria con respecto a esos microorganismos, *Malassezia pachydermatis* 01, 02, 03 y 04 se refiere a la identificación de los aislados; sin halo de inhibición; letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los mm de halo de inhibición media de los extractos. Por esto se concluye que el timol 45mm  $\pm$ 2.0 y carvacrol 38mm  $\pm$ 2.0 de estas plantas sería una alternativa para el tratamiento de la otitis externa.<sup>12</sup>

**García R. et al (Perú, 2007)** evaluaron el efecto de inhibición de los aceites esenciales de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* sobre 5 cepas bacterianas que son relevantes y que están relacionados con la alimentación como son *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* donde el extracto de *A. cepa* el cual demostró tener mayor actividad sobre *E. coli* excepto con *S. aureus*. Teniendo como resultados en el caso de *E. coli* lo siguiente *Escherichia coli* absorbancia  $0,733 \pm 0,004$  mm.<sup>13</sup>

**Herrera F. et al (Perú, 2006)** evaluaron el efecto bactericida de los aceites esenciales de canela, clavo de olor, laurel y tomillo sobre las diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *S. aureus* donde la canela muestra un gran espectro de acción. El extracto de tomillo fue más notorio en su actuación frente a la *salmonella* spp. En dilución de  $10^5$  viendo halos de inhibición de 15 mm y de 5 mm  $1,00E+03$  frente a *E. coli*.<sup>14</sup>

### 1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Los fármacos antimicrobianos vendrán a ser un agente que interrumpe alguna función microbiana, donde se distingue su toxicidad selectiva. Estos agentes tienen diferentes efectos y espectro de inhibición, también cabe destacar el espectro de acción sea amplio en algunos agentes como cierta limitación frente a otros patógenos.<sup>15</sup>

Siendo una lucha desde antes incluso cuando no se conocía exactamente el agente que producía cierta enfermedad, se combatió con estos agentes que provocaban la enfermedad con esencia con plantas medicinales, conocimientos que fueron siendo transmitidos de generación en generación, y siendo la naturaleza humana el descubrimiento, en el año 1929 cuando se descubre la penicilina y su posterior uso en la clínica, revolucionó el tratamiento de las patologías. Es desde ese momento en que se van incorporando muchos antimicrobianos donde ya se busca la discriminación respecto a las bacterias, hongos, parásitos y virus.<sup>16</sup>

Diferentes de estos agentes tienen efecto sobre más de un grupo. También existen los agentes que inhiben el crecimiento bacteriano, pero de modo reversible, esto significa que, si se retira el agente, el microorganismo podrá retomar su crecimiento, estos son conocidos como agentes estáticos. En cambio, también existen los agentes que destruyen al microorganismo diana, obviamente esto dependerá de su concentración, porque en bajos niveles podría ser estático, y en altos niveles sería "cida". Estos agentes que poseen un efecto "cida" en algunos microorganismos pueden tener efecto estático en otros.<sup>17</sup>

Plantas que se usan en el ámbito culinario y también usado como medicina tradicional, demostraron que tienen actividad antibacteriana, anti fúngica (acción contra hongos) y antivirales, esto se evidencia en los diferentes estudios que se realizaron "in vitro". Los investigadores han ido adaptando diferentes métodos experimentales para poder presentar futuras aplicaciones, aunque estos ensayos se afectan por una serie de factores como: el método con que se extrae el material de la planta, la cantidad o volumen de inóculo, la etapa de crecimiento, el medio de cultivo, su pH, el tiempo, la temperatura al incubar.<sup>18</sup>

Una forma de determinar el efecto que tienen los agentes antimicrobianos es obteniendo los aceites esenciales que son la fracción volátil de las plantas aromáticas y medicinales que tiene compuestos como terpenos y derivados los cuales se pueden obtener mediante diferentes técnicas como lo son la destilación donde separan los componentes de una muestra en función de la diferencia de presión de vapor y punto de ebullición, así también otro método es la hidro difusión que se realiza por medio de la vaporización, usando también el calor y la hidrólisis que provoca una reacción química entre el agua y los compuestos de la planta.<sup>19</sup>

Los aceites esenciales son líquidos que se obtienen de partes de plantas bien sea las flores o su semilla, las hojas, su rama, su fruto o sus raíces, cabe destacar que las partes de donde más se obtienen el aceite esencial es de la flor y la hoja. Son compuestos muy olorosos y que tienen la propiedad de ser solubles en el alcohol, pero no así en el agua, recientes estudios nos dieron a conocer sus diferentes actividades antimicrobianas contra un amplio espectro de bacterias y hongos. Estos aceites tienen una mezcla de componentes volátiles que son consecuencia de su metabolismo secundario. Estos compuestos casi siempre oxigenados por alcoholes, esterres y componentes fenólicos que le dan a los aceites el olor que los caracteriza.<sup>20</sup>

El tomillo tiene como origen en el mediterráneo: países como Italia, Grecia, y el sur de España y Francia. Inicialmente fue usado como planta aromática para preparar alimentos, en la época romana lo usaron para aliviar y combatir la tos; en el caso de los egipcios, fue usado para embalsamar a sus momias. En el siglo XI se comienza a cultivar en Europa. En la conquista llega a los países de América, actualmente es una de las plantas más conocidas y utilizadas. Su nombre científico es "*Thymus vulgaris*" que proviene del griego "*thym*"= perfumar; y "*vulgaris*"= común. Es un arbusto aromático, pequeño de 10 a 40 cm de altura con muchas ramas de aspecto leñoso, forman una mata muy tupida, las hojas de 3 a 8 mm son pequeñas, ovaladas, sentadas, afiladas, sus flores son blancas o de color rosado. Su componente principal es el aceite esencial, que se encuentra mayormente en las flores y las hojas. La esencia principal estará compuesta de 2 sustancias: El Timol que es incolora que posee un olor característico y el Carvacrol es un fenol presente también en el orégano al cual le da su olor característico.<sup>21</sup>

En los usos de la medicina tradicional es usado en las siguientes molestias: Digestión, Antiparasitario intestinal, Conjuntivitis, Dolor de garganta, Dolor muscular por esfuerzo, Halitosis e inflamaciones de las encías, Exceso de sudor en pies y manos, Infecciones en piel como hongos, Relajante en caso de



cansancio. Usos No medicinales: Aromatizante ambientes externos y Aromatizante ambientes internos.<sup>22</sup>

La mayoría de los gérmenes de *Escherichia coli* se encuentran presentes en el tracto intestinal, en donde son inofensivos en tanto no se desplacen a otras partes del cuerpo, como puede ser al tracto urinario o en las meninges donde si provocaran reacciones dañinas. La *E. coli* es una bacteria Gram (-), tiene como propiedad crecer en temperaturas muy bajas. Tiene como factores de riesgo la mala cocción de alimentos y la deficiente higiene, tanto como por el consumidor como el que manipula el alimento, también está implicado la demora en refrigerar los alimentos después de haber sido preparados.<sup>23</sup>

#### **1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿El aceite esencial de la hoja del *Thymus vulgaris* (tomillo) tiene efecto antibacteriano comparado con la oxacilina a la concentración de 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli*, en un estudio In Vitro?

## 1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Un problema que tenemos incluso en la actualidad es el uso indiscriminado de los antibióticos y la automedicación, que poco a poco nos limita el poder de acción de los medicamentos que conocemos, esto debido a la resistencia que se produce por parte de los microorganismos cuando no se realiza una medicación adecuada, la OMS advirtió respecto a su uso de forma indiscriminada y a sus consecuencias, por lo tanto fue una necesidad buscar tratamientos alternativos que nos ayuden a combatir estos gérmenes.

Con este trabajo se buscó encontrar, no solo una alternativa frente a los fármacos, los cuales tienen efectos secundarios sino también una alternativa económica; ya que el uso de aceites esenciales es una alternativa económica y además natural, por lo tanto, se reducen significativamente los efectos secundarios, porque se evitan el uso de químicos buscando realizarlo de la manera más natural posible. Se estuvieron y se están realizando muchos estudios que buscan este fin; por ello se necesita en nuestro medio hacer este tipo de aporte para sustentar científicamente el uso de medicina alternativa.

Desde años atrás, la aplicación de la medicina tradicional de manera profesional ya no es ajena en nuestro medio, por lo que representa la alternativa a los fármacos y a sus efectos adversos.

## 1.6 HIPÓTESIS

H<sub>1</sub>: El aceite esencial de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) tiene efecto antibacteriano comparado con Oxacilina a la concentración de 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC en un estudio in vitro.

H<sub>0</sub>: El aceite esencial de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) no tiene efecto antibacteriano comparado con Oxacilina a la concentración de 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC en un estudio in vitro.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **1.7.1 OBJETIVO GENERAL**

Se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de la hoja del *Thymus vulgaris* “Tomillo” con la Oxacilina a la concentración de 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, estudio “in vitro”.

### **1.7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Establecer el efecto antimicrobiano de las hojas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 100%.
- Establecer el efecto antimicrobiano de las hojas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 75%.
- Establecer el efecto antimicrobiano de las hojas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 50%.
- Establecer el efecto antimicrobiano de las hojas de aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25%.
- Establecer el efecto antimicrobiano de la Oxacilina a concentración de 1 µg.

## II. MÉTODO

### 2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Básico.

**DISEÑO DE INVESTIGACION:** Experimental con repeticiones múltiples.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5

Donde:

RG: grupos de estudio: 06

X1: hojas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* al 25%

X2: hojas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* al 50%

X3: hojas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* al 75%

X4: hojas del aceite esencial de *Thymus vulgaris* al 100%

X5: tratamiento con: Oxacilina a concentración de 1 µg.

O: las observaciones.

## 2.2. VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

**Variable Independiente:** tratamiento antimicrobiano para cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

- a) Tratamiento no farmacológico: aceite esencial de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo)
- b) Tratamiento farmacológico: Oxacilina.

**Variable Dependiente:** efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo).

- a) Eficacia: aumento del halo de inhibición
- b) No eficaz: disminución del halo de inhibición.

### OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR ES	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>V. I:</b> Esquema de tratamiento para cepas de <i>E. coli</i> ATCC 25922	<b>Para el tratamiento sobre <i>E. coli</i> se utiliza:</b>  Tratamiento no farmacológico con tomillo <sup>20,21</sup>  Tratamiento farmacológico con Oxacilina <sup>23</sup>	Sera dividido en los siguientes grupos:  a) Dilución al 100% b) Dilución al 75% c) Dilución al 50% d) Dilución al 25% e) Oxacilina 1ug	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5	Cualitativa nominal
<b>V. D:</b> Eficacia del tratamiento	Es la disminución de Halo de inhibición con el método Kirby Bauer <sup>24</sup>	Se considera eficaz si: <sup>29</sup>  a) Sensible $\geq 13$ mm b) Indiferente 10-12 mm c) Resistente $< 10$ mm	Eficaz (sensible)  No eficaz (indiferente o resistente)	Cualitativa nominal

## 2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

**POBLACION:** Estará constituido por todas las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo bajo condiciones controladas.

### **MUESTRA:**

**Tamaño de muestra:** En el presente estudio se aplicó la fórmula para diferencia de dos promedios (los halos de inhibición) Se obtuvo una muestra de 10 repeticiones por cada grupo de experimentación. (Anexo 01)

**Unidad de análisis:** Cada una de las cepas.

**Unidad de muestra:** Cada placa Petri de cultivo.

**Muestreo:** Aleatorio simple.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN:**

#### **Criterios de inclusión:**

- Cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 25922

#### **Criterios de exclusión:**

- Cepas contaminadas de *Escherichia coli*.
- Cultivos de *Escherichia coli* > 24 horas.
- Cepas de *Escherichia coli* que no pudiera ser restablecidas en medio de cultivo.

## **2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD**

**LA TÉCNICA:** Se utilizó la técnica de observación directa.

### **PROCEDIMIENTO:**

- a. Certificación de la planta por parte de la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO) (Ver anexo N° 02).
- b. Para la extracción del aceite esencial del *Thymus vulgaris* (tomillo), se utilizará la técnica por arrastre a vapor de agua.<sup>19</sup> (Ver anexo N° 03).
- c. Técnica que se empleó para el cultivo.<sup>28-29</sup> (Ver anexo N° 04).
- d. Determinación de la sensibilidad (eficacia antimicrobiana) la técnica de Kirby Bauer<sup>25</sup> (Ver anexo N° 05).

**INSTRUMENTO:** Se utilizó ficha de recolección de datos donde se registró el número de placas Petri, las diluciones y los halos de inhibición a las 48 y 72 horas (Ver Anexo N° 06).

### **VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO**

El instrumento fue validado por opinión de tres profesionales quienes evaluaron que las variables de estudio y los ítems considerados en la ficha de recolección de datos, fueran relevantes al estudio que tuvieran claridad, objetividad, actualidad, organización, suficiencia, intencionalidad, consistencia, coherencia, metodología y oportunidad para su aplicación.<sup>31</sup> (Ver anexo N°07)

## **2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS**

La información transcrita en la ficha de recolección de datos, fue procesada de base de datos en el programa SPSS 25.0 versión para Windows. La información se presenta en las tablas y gráficos.

Las pruebas estadísticas aplicadas en el presente estudio experimental fueron: el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la diferencia entre los resultados de diámetros. Y el análisis estadístico de Post ANOVA de Tukey para ver la homogeneidad de la muestra y el grupo que tuvo mayor efecto antibacteriano.

## **2.6 ASPECTOS ÉTICOS:**

El estudio se realizó respetando los criterios de la Normas de Ética en la investigación considerados en la declaración de Helsinki<sup>26-31</sup>, considerando que es un estudio experimental sólo tuvo acceso la investigadora y el asesor técnico. Se obtuvo también la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo a realizar esta investigación, respetando los niveles de bioseguridad. Normas de PRONAHEBAS del MINSA.<sup>27</sup>



### III. RESULTADOS

**Tabla 01:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* “tomillo” comparado con oxacilina 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, estudio in vitro

#### Descriptivos

Extractos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
100%	10	15,20	1,932	,611	13,82	16,58
75%	10	10,30	1,513	,478	9,22	11,38
50%	10	7,90	1,197	,379	7,04	8,76
25%	10	7,60	1,329	,420	6,65	8,55
Oxacilina	10	21,35	2,381	,753	19,65	23,05
Total	50	12,47	5,515	,780	10,90	14,04

Fuente: Reporte de resultados SPSS ver. 25

**Tabla 02:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* “tomillo” comparado con oxacilina 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, estudio in vitro

#### ANOVA

Extractos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1356,180	4	339,045	113,837	,000
Dentro de grupos	134,025	45	2,978		
Total	1490,205	49			

Fuente: Reporte de resultados SPSS ver. 25

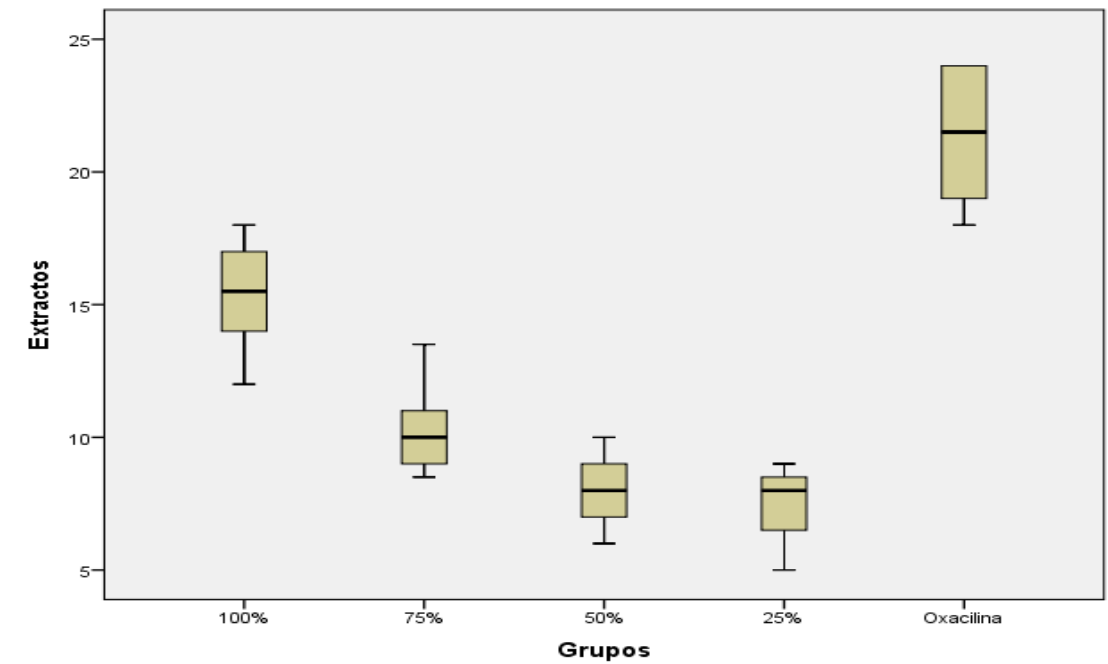
**Tabla 03:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* “tomillo” comparado con oxacilina 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, estudio in vitro.

**PRUEBAS POST HOC TUKEY**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25%	10	7,60			
50%	10	7,90			
75%	10		10,30		
100%	10			15,20	
Oxacilina	10				21,35
Sig.		,995	1,000	1,000	1,000

Fuente: Reporte de resultados SPSS ver. 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS ver. 25

**GRÁFICO Nº 01** Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* (tomillo) comparado con oxacilina 1 µg, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, estudio in vitro.

#### IV. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre *Escherichia coli* y se estableció grupos de dilución al 100%, 75%, 50%, 25%, comparados con oxacilina 1 µg.

En la evaluación de la media de los diámetros promedios de inhibición antibacteriana (Tabla 01), se observa que a partir de la dilución al 100%, la media del halo de inhibición fue 15.20 mm (DS:  $1.93 \pm 0.611$  IC95%(13.82-16.58)) con un rango de 12 a 18 mm de halo de inhibición. Por lo tanto, según el CLSI, ( $\geq 13$  mm), se considera sensible demostrando que tiene efecto antibacteriano; sin embargo, no supera a la oxacilina que tuvo un halo de inhibición de 21.35 mm (DS:  $2.38 \pm 0.75$  IC95%(19.65-23.05)) con un rango de 18 a 24 mm.

Las concentraciones de 75% (10.30 mm) (DS:  $1.51 \pm 0.48$  IC95%(9.22-11.38)) con un rango de 9 a 14 mm de halo de inhibición, 50% (7.90 mm) (DS:  $1.20 \pm 0.38$  IC95%(7.04-8.76)) con un rango de 6 a 10 mm de halo de inhibición, y 25% (7.60 mm) (DS:  $1.33 \pm 0.42$  IC95%(6.65-8.55)) con un rango de 5 a 9 mm de halo de inhibición; evidenciaron halos menores, considerándose como indiferente (75%) y resistentes (50% y 25% de dilución).

Estadísticamente los datos se corroboran con el análisis de ANOVA (tabla 02) cuyos resultados del experimento indican que son altamente significativos (0,000) y Tukey (tabla 03) refleja la homogeneidad de la muestra y los resultados, asimismo en la figura 01 se observa las medias de los halos de inhibición al aumentar la concentración (50%, 75%, 100%) se evidencia efecto anticacteriano, sin embargo, no supera el efecto antibacteriano de la oxacilina (21.35 mm).

Los resultados encontrados en esta investigación son mayores a **Coy C. (Cuba, 2013)** quienes obtuvieron resultados de 2 mm, frente a *E. coli* y como halos del grupo control 6.5 mm, kanamicina 6.8 mm y tetraciclina 10mm y determinan

que no presentan un porcentaje de inhibición significativo frente a E. coli. **Herrera F. et al (Perú, 2006)** tuvieron como resultado un halo de 15mm 15 mm y de 5 mm 1,00E+03 frente a E. coli. **Luna M. et al (Argentina, 2015)** quienes encontraron en concentraciones combinadas con oregano ( $2,53\text{mm} \pm 0,10$ ) con tiempo de exposición de 5 min y ( $3,05\text{mm} \pm 0,03$ ) 10 min.

**García et al., 2008** reportó que el carvacrol afecta la síntesis de componentes estructurales, inhibiendo la producción de flagelos a determinada concentración 1 mm, sin síntesis de sus flagelos provocando estrés en la E. coli y a una concentración de 5 mm inmovilidad y luego muerte celular. Y respecto al timol es similar siendo este capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram (-) permeabilizándolo.

Teniendo en cuenta que estas diferencias entre los autores, pueden estar en relación a la obtención de la planta, lugar de crecimiento o de sembrío, técnica de extracción del principio activo que influyen sobre la concentración de sus componentes bioquímicos.

## V. CONCLUSIONES

El aceite de *Thymus vulgaris* “tomillo” demostró tener efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* según CLSI ( $\geq 13$ )

- A la dilución 100% la media del halo de inhibición fue mayor según CLSI considerándolo sensible para la bacteria *Escherichia coli*
- Las concentraciones menores de 100% el efecto antibacteriano fue menor considerándolos indiferentes 75% y resistentes al 50% y 25%
- El efecto antibacteriano de la *Thymus vulgaris* sobre *Escherichia coli* aumenta cuando aumenta la concentración del producto.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar estudio y probar el efecto antibacteriano con bacterias Gram positivas y Gram negativas.
2. Ampliar más el estudio para evaluar la sinergia de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a otros fármacos de interés terapéutico en el tratamiento de afecciones frente a *Escherichia coli* u otros patógenos.
3. Utilizar el producto como tratamiento coadyuvante a un tratamiento antibiótico convencional.
4. Realizar el estudio de cada componente del aceite esencial.
5. Elaborar un trabajo en animales vivos en bioterio.
6. Comparar la planta con otras las mismas especies de otra localidad para poder ver si las propiedades implican en los resultados.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Organización Mundial de la Salud, Temas de salud, Escherichia coli [citado el 14 Abril de 2018]. Disponible desde: [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
2. Organización Mundial de la Salud, Centro de prensa, Resistencia a los antibióticos, [citado el 14 Abril de 2018]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
3. Annual Report 2012, Global Mountain Action, pp. 21-29. Hierbas Aromáticas Andinas [Internet]. 2010. [citado el 14 Abril de 2018]. Disponible desde: [http://www.academia.edu/6919141/Hierbas\\_Arom%C3%A1ticas\\_Andinas\\_2012](http://www.academia.edu/6919141/Hierbas_Arom%C3%A1ticas_Andinas_2012)
4. Morales Castro AF, others. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del tomillo (Thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso Ricotta [Internet]. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín; 2015 [citado 22 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/50994/>
5. Luna M, Luna J, Ruiz H, Leyva L, Diaz C. Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre Escherichia coli inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante. Rev Argent Microbiol. 2015;47(3): 251-255  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000553>
6. Rojas Fernández MM, Corzo López M, Sánchez Pérez Y, Brito D, Montes de Oca R, Martínez Y, et al. Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum. Revista de Protección Vegetal. 2014;29(3):197–203.
7. Borboa-Flores, J, Rueda-Puente, E., Acedo-Félix, E. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE ACEITES ESENCIALES CONTRA Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis. 2005 [citado 22 de junio de 2017]; Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/939/93915170014.pdf>
8. Coy C, Acosta G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de Rosmarinus officinalis, Thymus vulgaris y Curcuma longa de Colombia. Rev Cuba Plantas Medicinales. 2013;18(2): 237-246

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000200007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007)

9. Ríos Macedo MA, Hernandez Flores Jhon Klaussen. Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; por el método de macrodilución y difusión en AGAR [Internet]. [Perú]: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA; 2016 [citado 21 de junio de 2017]. Disponible en:  
<http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/3854>
10. Rojas J, Ortiz J, Jauregui J, Ruiz J, Almonacid R. Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema. *An Fac med.* 2015;76(3): 235-240  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832015000400002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832015000400002&script=sci_arttext)
11. Garcia R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interes en alimentos. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos.* 2008; 2(2): 41-51  
[http://www.udlap.pe/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.pe/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
12. De Souza L, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M, Damé L, Araujo M. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Rev pla.* 2008;13(4)  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003)
13. Garcia R, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interes en alimentos. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos.* 2008; 2(2): 41-51  
[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
14. Herrera F, Garcia R. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *BISTUA.* 2006;4(2): 13-19  
<http://www.redalyc.org/pdf/903/90340202.pdf>
15. Oscar Villavicencio V. La Fitoterapia a través del tiempo. En: *Manual de Fitoterapia.* Perú: 2001. p. 9-14.  
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap1.pdf>



16. Finegold, S. M.; Baron, E. J. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1989.
17. Goodman & Gilman, Blengio Pinto JR, Orizaga Samperio J, Pérez-Tamayo Ruiz AM, Brunton LL, Lazo JS, et al. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2007.
18. Oscar Villavicencio Vargas, Martha Villar López. Manual de Fitoterapia. 2001ª ed. Perú: PAHO; 405 p.
19. Arraiza MP. Curso: Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales. Tema 12: Análisis químico de plantas aromáticas. Universidad Politécnica de Madrid, 2009. [citado 16 sep 2017] p.109. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
20. Díaz-Barriga Arceo F, Hernández Rojas G, others. Estrategias docentes para un aprendizaje significativo. Una interpretación constructivista [Internet]. 2002 [citado 24 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SIDINA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003250>
21. Díaz-Barriga Arceo F, Hernández Rojas G, others. Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales [Internet]. Zagreca; 2002 [citado 24 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/archivos/200701/260307libro-2.pdf?1>
22. Jorge Cruz Suarez. Mas de 100 plantas medicinales [Internet]. Octubre 2007. Cuzco: Perez Galdos; [citado 24 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.fitoterapia.net/archivos/200712/100pm-2.pdf?1>
23. Patrick R. Murray, Ken R. Rosenthal, Michael A. Pfaller. Microbiología Médica Murray 7a Edición [Internet]. 7ma ed. El sevier; 2014 [citado 24 de junio de 2018]. 984 p. Disponible en: <http://booksmedicos.org/microbiologia-medica-murray-7a-edicion/>
24. Epidat: Ayuda de muestreo. 2014 . 2 (1), 89. Consultado 2017 mayo 18. Disponible en: [https://www.sergas.es/gal/documentacionTecnica/docs/SaudePublica/Apli/Epidat4/Ayuda/Ayuda\\_Epidat4\\_Muestreo\\_Octubre2014.pdf](https://www.sergas.es/gal/documentacionTecnica/docs/SaudePublica/Apli/Epidat4/Ayuda/Ayuda_Epidat4_Muestreo_Octubre2014.pdf)

25. Juliet C. Estudio de susceptibilidad in vitro de Staphylococcus spp. Revista Chilena de infectología. 2002. 19 (2), 116 – 118. Consultado 2017 junio 09. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art10.pdf>
26. Velasquez RAC. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial-Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Seúl, octubre de 2008. Journal of Oral Research. 2013;2(1):42–44.
27. Ortiz Cabanillas P. Acerca del Código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú: fundamentos teóricos. Acta Médica Peruana. 2008;25(1):46–47.
28. PERÚ MDSD, INDS. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. [Online].; 2002 [cited 2018 AGOSTO 16. Available from: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua\\_l%20sensibilidad.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf)
29. Melvin P, Jean B, Shelley C, et.al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). USA. 2018. 100 (28) 20-61. Consultado 2018 agosto 11. Disponible en: <file:///D:/REFERENCIA%20TESIS/CLSI-2018-M100.pdf>
30. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Sena. Consultado 2018 agosto 2018. Disponible en: <file:///D:/REFERENCIAS%20TESIS/ACEITES%20ESENCIALES%20EXTRAIDOS%20DE%20PLANTAS%20MEDICINALES%20Y%20AROMATICAS.pdf>
31. Asociación Médica Mundial Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos 2018 Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO Nº 01

#### TAMAÑO DE MUESTRA

Por tratarse de un trabajo experimental, se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para el cálculo del número de placas necesarias que validen el diseño experimental. Se calculó mediante la fórmula (Machin 1997, p 102)<sup>24</sup>

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2 \sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

**Donde:**

$Z_{\alpha/2} = 1.96$  (nivel de confianza al 95%)

$Z_{\beta} = 0.842$  (nivel de confianza 80%)

$X_1 = 35.33$  promedio de halo de inhibición Experimental. (Rojas J. et al)<sup>10</sup>

$X_2 = 30.33$  promedio de halo de inhibición Control. (Rojas J. et al)<sup>10</sup>

$\sigma^2 = 0.58$  Desviación Estándar.

**Reemplazando:**

$$n = \frac{(1.96 + 0.842)^2 2 (0.58)^2}{(31.07 - 30.33)^2}$$

$$n = \frac{5.2822}{0.548} \quad n = 9.63$$

Se consideró **10 placas** Petri que multiplicado por las 6 diluciones en diferentes concentraciones a realizarse hacen un total de **60 placas** Petri.

**ANEXO Nº 02**  
**CERTIFICACION DE PLANTA**

---



**UPAO**

Museo de Historia Natural y Cultural

**HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)**

**CONSTANCIA Nº 35-2018-HAO-UPAO**

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

**CONSTANCIA**

Que **Víctor Burgos Chipana**, estudiante de la carrera profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

*Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* (tomillo) comparado con oxacilina sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 estudio *in vitro*".

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 21 de septiembre de 2018



  
**Mg. Segundo Leiva González**

Director

Museo de Historia Natural y Cultural



**HERBARIO ANTEOR ORREGO (HAO)**  
UNIVERSIDAD PRIVADA ANTEOR ORREGO  
TRUJILLO - PERÚ



LAMIACEAE

*Thymus vulgaris* L.

"tomillo"

Subarbusto pequeño de 20-30 cm de alto, flores blanquecinas.

Zona pedregosa.

Distrito La Cuesta, prov. Otuzco, región La Libertad, Perú.

1800 m s. n. m.

IV-2018

Victor Burgos Chipana s/n

Tesis: Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* (tomillo) comparado con oxacilina sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 estudio *in vitro*.



## ANEXO 03

### PROCEDIMIENTO

#### 1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Thymus vulgaris* “tomillo”, se obtuvieron en el distrito la cuesta, localidad de Otuzco, en una cantidad de 4 a 5 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



## 2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.



## ANEXO N°04

### TÉCNICA DE CULTIVO EMPLEADA

#### 3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.





## ANEXO Nº 05

### DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA (EFICACIA ANTIMICROBIANA) LA TÉCNICA DE KIRBY BAUER

#### 4. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

##### a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Thymus vulgaris*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml aprox.)

##### b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Thymus vulgaris*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

##### c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 µL de AE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de AE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de AE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.



a) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10  $\mu$ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10  $\mu$ L de AE al 25% y se colocó en un disco, 10  $\mu$ L de AE al 50% en otro disco, 10  $\mu$ L de AE al 75% en otro disco y 10  $\mu$ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

b) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Thymus vulgaris*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con oxacilina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.



a) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de *Thymus vulgaris* y para la oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.





# ANEXO Nº 06

## FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA MEDIR EL HALO DE INHIBICION SOBRE *Escherichia coli* ATCC 25922.

<b>PATOGENO</b> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<b>CONCENTRACION DEL ACEITE ESENCIAL <i>Thymus vulgaris</i> "TOMILLO"</b>				<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
<b>N° de Muestras</b>	<b>DIAMETRO DE HALO DE INHIBICION (mm)</b>					
	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>	<b>100%</b>	<b>Oxacilina</b>	<b>Solución salina</b>
Placa 1	8	8	10	12	19	0
Placa 2	9	7	11	17	21	0
Placa 3	8	10	9	16	22	0
Placa 4	8	8	10	14	24	0
Placa 5	6,5	6	8,5	16	18,5	0
Placa 6	8,5	7	12	15	20	0
Placa 7	6	9	10	17	24	0
Placa 8	5	9	13,5	14	23	0
Placa 9	8	8	10	13	24	0
Placa 10	9	7	9	18	18	0



## ANEXO Nº 07

### VALIDACION Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

#### VALIDACION Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

<b>PATOGENO</b> <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<b>CONCENTRACION DEL ACEITE ESENCIAL</b> <i>Thymus vulgaris</i> "TOMILLO"				<b>CONTROL POSITIVO</b>	<b>CONTROL NEGATIVO</b>
<b>Nº de Muestras</b>	<b>DIAMETRO DE HALO DE INHIBICION (mm)</b>					
	<b>25%</b>	<b>50%</b>	<b>75%</b>	<b>100%</b>	<b>Oxacilina</b>	<b>Solución salina</b>
Placa 1						
Placa 2						
Placa 3						
Placa 4						
Placa 5						
Placa 6						
Placa 7						
Placa 8						
Placa 9						
Placa 10						

Validado por Mg. Jaime Polo Gamba  
CBP 6951



Validado por: Dr. Juan Benín Figueroa

Validado por: Dra. María Ayala Rueda

## ANEXO Nº 08

Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas del *Thymus vulgaris* (tomillo) comparado con oxacilina, sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC25922.

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Extractos

HSD Tukey

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
100%	75%	4,900 <sup>*</sup>	,772	,000	2,71
	50%	7,300 <sup>*</sup>	,772	,000	5,11
	25%	7,600 <sup>*</sup>	,772	,000	5,41
	Oxacilina	-6,150 <sup>*</sup>	,772	,000	-8,34
75%	100%	-4,900 <sup>*</sup>	,772	,000	-7,09
	50%	2,400 <sup>*</sup>	,772	,026	,21
	25%	2,700 <sup>*</sup>	,772	,009	,51
	Oxacilina	-11,050 <sup>*</sup>	,772	,000	-13,24
50%	100%	-7,300 <sup>*</sup>	,772	,000	-9,49
	75%	-2,400 <sup>*</sup>	,772	,026	-4,59
	25%	,300	,772	,995	-1,89
	Oxacilina	-13,450 <sup>*</sup>	,772	,000	-15,64
25%	100%	-7,600 <sup>*</sup>	,772	,000	-9,79
	75%	-2,700 <sup>*</sup>	,772	,009	-4,89
	50%	-,300	,772	,995	-2,49
	Oxacilina	-13,750 <sup>*</sup>	,772	,000	-15,94
Oxacilina	100%	6,150 <sup>*</sup>	,772	,000	3,96
	75%	11,050 <sup>*</sup>	,772	,000	8,86
	50%	13,450 <sup>*</sup>	,772	,000	11,26
	25%	13,750 <sup>*</sup>	,772	,000	11,56

Fuente: Reporte de resultados SPSS ver. 25



**CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO DE TESIS**

El que suscribe, Jaime Polo Gamboa responsable del área de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas.

**Hace CONSTAR**

Que, el(la) estudiante Víctor Burgos Chipana de esta Superior Casa de Estudios, solicitó los ambientes de la Universidad César Vallejo para la ejecución de su Proyecto de Tesis. Por lo que, se le brindó todas las facilidades para que realice su trabajo de investigación experimental e hizo uso de los laboratorios, instrumental y equipos para ejecutar su Proyecto de Tesis titulado:  
**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922**

Utilizó el(los) laboratorio(s) de Microbiología desde el 18 de Noviembre hasta el 28 de Noviembre del año 2017.

Se expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 3 días del mes de Diciembre del año 2017.

Firma y sello:

  
Jaime A. Polo Gamboa  
MICROBIOLOGO  
COP 6001



## CONSTANCIA DE ASESORIA DE DESARROLLO DE TESIS

El que suscribe **Mg Luis Fernández Sosaya**, docente de Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académica Profesional de Medicina.

CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Ejecución de Tesis para obtener el título Profesional Médico Cirujano, del Alumno: **Víctor Burgos Chipana**, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento el Desarrollo de Tesis titulado.

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL Thymus vulgaris (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE Escherichia coli ATCC25922**

Que será presentado para optar el título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor TECNICO, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la ciudad de Trujillo a los 29 días del mes de octubre del 2018.

  
The stamp contains the text: RED ASISTENCIAL LA LIBERTAD, CENTRO DE MEDICINA COMPLEMENTARIA, 1718, Mg Luis Fernández Sosaya, MEDICO CIRUJANO.  
**Mg Luis Fernández Sosaya**



## CONSTANCIA DE ASESORÍA DE TESIS

El que suscribe **Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez**, docente de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela Académico Profesional de Medicina.

### CERTIFICA:

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis para obtener el Título Profesional Médico Cirujano, del alumno: **Víctor Burgos Chipana**, de esta casa de estudios, está trabajando bajo mi asesoramiento la Tesis titulado:

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Thymus vulgaris* (tomillo) COMPARADO CON OXACILINA, SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922**

Que será presentado para optar el Título anteriormente mencionado.

En tal virtud, asumo el asesoramiento de dicho proyecto, en calidad de Asesor METODOLÓGICO, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada para los fines académicos que estime conveniente, la Ciudad de Trujillo a los 30 días del mes de noviembre de 2018.

**Dra. María Rocío Del Pilar Llaque Sánchez**